


**А. Рыскалиева^{1,2}, З. Крупова³, С. Хенри⁴,
Б. Файе⁵, Г.С. Конуспаева^{6*} , П. Мартан¹**

¹ИНРА, группа GABI, АгроПариТек, Университет Париж-Саклай, Франция, г. Жой-эн-Жосас

²ТОО Научно-производственное предприятие Антиген, Казахстан, Алматинская область

³Эксилон, Франция, г. Эланкур

⁴ИНРА, MICALIS Институт, PAPPSO, Университет Париж-Саклай, Франция, г. Жой-эн-Жосас

⁵СИРАД, группа SELMET, Франция, г. Монпелье

⁶Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы,

*e-mail: konuspayevags@hotmail.fr

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКЗОСОМ МОЛОКА *CAMELUS DROMEDARIUS*, *CAMELUS BACTRIANUS* И ГИБРИДОВ КАЗАХСТАНА

Молоко содержит внеклеточные везикулы, которые высвобождаются клетками молочной железы и распознаются как новый механизм передачи информации от матери к новорожденному. В данном исследовании из молока *C. dromedarius*, *C. bactrianus* и гибридов Казахстана выделены внеклеточные везикулы с помощью оптимизированного ультрацентрифугирования в градиенте плотности. Везикулы визуализированы с помощью просвечивающей электронной микроскопии и охарактеризованы с использованием анализа отслеживания наночастиц. Очищенные внеклеточные везикулы имели гетерогенное распределение размером в диапазоне от 25 до 170 нм в диаметре со средним выходом $9,5 \times 10^8$ – $4,2 \times 10^{10}$ частиц на миллилитр молока. Сочетая классический и продвинутый протеомный подходы, проведен комплексный протеомный анализ везикул верблюжьего молока. Идентифицировано 1010 уникальных белков, участвующих в различных биологических процессах, включая большое количество маркеров, связанных с маленькими везикулами. В результате внеклеточные везикулы верблюжьего молока обогащены экзосомными белками. Наиболее распространенные биологические процессы были связаны с процессами синтеза и секреции экзосом и в основном вовлечены в молекулярные функции, такие как поли РНК и АТФ-связывание, белковое связывание и структурная составляющая рибосомы.

Ключевые слова: верблюжье молоко, экзосомы, внеклеточные везикулы, протеом.

A. Ryskaliyeva^{1,2}, Z. Krupova³, C. Henry⁴, B. Faye⁵, G.S. Konuspayeva^{6*}, P. Martin¹

¹INRA, UMR GABI, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, France, Jouy-en-Josas

²Scientific-production enterprise Antigen Ltd, Kazakhstan, Almaty region

³Excilone, France, Elancourt,

⁴INRA, MICALIS Institute, PAPPSO, Université Paris-Saclay, France, Jouy-en-Josas

⁵CIRAD, UMR SELMET, France, Montpellier

⁶Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty,

*e-mail: konuspayevags@hotmail.fr

Fundamental studies of milk exosomes *Camelus dromedarius*, *Camelus bactrianus* and hybrids from Kazakhstan

Milk contains extracellular vesicles that are released by udder cells and are recognized as a new mechanism for transmitting information from mother to newborn. In this study, extracellular vesicles were isolated from milk of *C. dromedarius*, *C. bactrianus* and hybrids from Kazakhstan using optimized density gradient ultracentrifugation. Vesicles were visualized using transmission electron microscopy and characterized using nanoparticle tracking analysis. The purified extracellular vesicles had a heterogeneous size distribution ranging from 25 to 170 nm in diameter with an average yield of 9.5×10^8 – 4.2×10^{10} particles per milliliter of milk. Combining classical and advanced proteomic approaches, a comprehensive proteomic analysis of camel milk vesicles was carried out. One thousand ten (1010) unique proteins have been identified that are involved in various biological processes, including most markers associated with small vesicles. As a result, the extracellular vesicles of camel milk are enriched with exosomal proteins. The most common biological processes have been associated with the synthesis

and secretion of exosomes. They are mainly involved in molecular functions such as poly RNA and ATP binding, protein binding and structural constituent of the ribosomes.

Key words: camel milk, exosomes, extracellular vesicles, proteome.

А. Рыскалиева^{1,2}, З. Крупова³, С. Хенри⁴, Б. Файе⁵, Г.С. Конуспаева^{6*}, П. Мартан¹

¹ИНРА, GABI зерттеу ұяшығы, АгроПариТек, Париж-Саклай Университеті, Франция, Жой-эн-Жосас қ.

²Антиген ЖШС Ғылыми-өндірістік кәсіпорны, Қазақстан, Алматы облысы

³Эксилон, Франция, Эланкур қ.

⁴ИНРА, MICALIS Институты, RAPPISO, Париж-Саклай Университеті, Франция, Жой-эн-Жосас қ.

⁵СИРАД, SELMET зерттеу тобы, Франция, Монпелье қ.

⁶Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.,

*e-mail: konuspayevags@hotmail.fr

Қазақстанның *Camelus dromedarius*, *Camelus bactrianus* және гибридер сүтінің экзосомаларын фундаменталды зерттеулері

Сүттің құрамында жасушадан тыс везикулалар болады, олар сүт бездерімен шығарады және анадан жаңа туылған нәрестеге ақпаратты берудің жаңа жолы механизмі ретінде танылуда. Бұл зерттеуде жасушадан тыс везикулалар тығыздық градиентті ультрацентрифуацияны қолдана отырып, Қазақстанның *C. dromedarius*, *C. bactrianus* және гибридердің сүтінен бөлініп алынды. Везикулалар трансмиссиялық электронды микроскопия көмегімен бейнеленді және нанобөлшектерді бақылаудың көмегімен сипатталды. Тазартылған жасушадан тыс везикулалардың диаметрі 25-тен 170 нм-ге дейін аралықта табылды, олардың мөлшері $9,5 \cdot 10^8$ - $4,2 \cdot 10^{10}$ бөлшектер бір мл сүтінде кездеседі. Классикалық және протеомикалық тәсілдерді біріктіре отырып, түйе сүтінің везикулаларына кешенді протеомикалық анализ жасалды. Анализ барысында әр түрлі биологиялық процестерге қатысты 1010 түрлі белоктар анықталды, оның ішінде кішкентай везикулаларға байланысты әсіресе маркерлер көп. Нәтижесінде түйе сүтінің жасушадан тыс везикулалары экзосомалық белоктармен ерекше байытылған. Осындай белоктардың ішінде биологиялық процестер бойынша ең көп таралған белоктар экзосомалардың синтезі мен секрециясымен байланысты болды. Оның ішінде ерекше көп кездесетін поли РНК және АТФ байланыстыру, белок байланыстыру және рибосоманың құрылымдық құрамы сияқты молекулалық функцияларға қатысады.

Түйін сөздер: түйе сүті, экзосомалар, жасушадан тыс везикулалар, протеом.

Сокращения и обозначения

ЖХ-МС/МС – жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрии, РНК – рибонуклеиновая кислота, ГТФазы – на английском GTPases – большое семейство ферментов гидролаз, которые связывают и гидролизуют гуанозинтрифосфат.

Введение

Молоко является единственным источником питательных веществ для новорожденного и грудного ребенка, а также важным средством передачи иммунных компонентов от матери к новорожденному, иммунная система которого только начинает свое становление. Молоко является сложной биологической жидкостью, в которой обнаружены надмолекулярные структуры (мицеллы казеина и глобулы молочного жира) после минералов, витаминов и растворимых белков (белков молочной сыворотки). Молоко также является источником доставки молекул через экзосомы и/или микровезикулы,

которые действуют на иммунную модуляцию новорожденных благодаря их специфическим белкам и генетическому материалу, несущие широкий спектр соединений с биологической активностью. РНК содержащаяся в этих везикулах может передаваться из одной клетки в другую посредством межклеточной коммуникации (Colombo, Raposo, and Théry 2014). По этой причине экзосомы считаются потенциальными носителями межклеточной коммуникации, способными передавать сообщения сигнальных молекул, нуклеиновых кислот и патогенных факторов (Kabani and Melki 2016). Если учесть, что внеклеточные везикулы, выделенные из молока, содержат микроРНК, то эти везикулы должны быть признаны в качестве другого важного биологически активного компонента молока, который может участвовать в передаче иммунных компонентов от матери к новорожденному. Также такой переход микроРНК представляет собой источник факторов, потенциально ответственные за свойства, приписываемые молоку за его лечебные и терапевтические свойства для здоровья потребителей.

Везикулы классифицируются в зависимости от субклеточных источников на три основных суб-типа: микровезикулы, экзосомы и апоптические тела. Экзосомы представляют наименьшую популяцию среди экзосом диаметром от 30 до 150 нм (Hgomada et al. 2017). Они образуются в виде прозрачных пузырьков внутри мультивезикулярных тел в эндосомальном компартменте во время созревания ранних, поздних эндосом и высвобождаются во внеклеточную среду при сливании этих компартментов с плазматической мембраной (van der Pol et al. 2012). Связанные с мембраной трансмембранные белки и РНК избирательно включаются во внутрисветлый пузырек эндовезикулярной эндосомы или в микровезикулы, отщепляющиеся от плазматической мембраны. Найденные во всех биологических жидкостях экзосомы несут различное содержимое в зависимости от способа биогенеза, типа клеток и физиологического состояния (Abels and Breakefield 2016).

Таким образом, цель данного исследования была разработка методов выделения экзосом, получение фундаментальных представлений и характеристик экзосом верблюжьего молока *C. dromedarius*, *C. bactrianus* и гибридов Алматин-

ской, Туркестанской, Кызылординской и Атырауской областей Казахстана.

Материалы и методы исследования

Забор проб верблюжьего молока по Казахстану

В общей сложности анализы включали 179 образцов (Таблица 1), представляющие разнообразие существующего в Казахстане верблюжьего молока. Основная цель данного забора проб – снизить факторы, отличающиеся между собой, чтобы максимально увидеть различия между видами животных: одногорбые (*Camelus dromedarius*), двугорбые (*Camelus bactrianus*) или их гибриды. По гибридам в основном приоритете были животные, полученные в ходе скрещивания в первом поколении – F1. Однако, в связи с нерегулярным учетом животных, в некоторых случаях сложно было определить, являются ли животные результатом скрещивания в первом поколении.

Все дойные верблюдицы находились между 30 и 90 днем лактации. Образцы были собраны в 4 контрастных регионах страны: Алматинская, Туркестанская, Кызылординская и Атырауская области.

Таблица 1 – Забор проб верблюжьего молока по Казахстану

Область	<i>C. dromedarius</i>	<i>C. bactrianus</i>	Гибрид	Всего
Алматинская	20	13	1	34
Туркестанская	21	20	20	61
Кызылординская	16	18	20	54
Атырауская	8	21	1	30
Всего	65	72	42	179

Обезжиривание молока

Образцы цельного верблюжьего молока обезжировали путем центрифугирования (Beckman Coulter, Франция) при 3000 g в течение 30 минут при температуре 4°C для отделения жира от обезжиренного молока. Образцы замораживаются при -80 ° C (жир) и -20 ° C (обезжиренное молоко) до последующих анализов.

Экстракция внеклеточных везикул из верблюжьего молока

Образцы обезжиренного верблюжьего молока объемом 40-45 мл инкубировали при 37°C в течение 30 минут на водяной бане для усиления адсорбции свободного казеина на мицеллах ка-

зеина. Затем молоко подкисляли добавлением уксусной кислоты и для осаждения казеинов инкубировали при 37°C в течение 5 минут. Наконец, раствором ацетата натрия была проведена нейтрализация с последующим дополнительным инкубированием при комнатной температуре в течение 5 минут и центрифугированием при 1500 g в течение 15 минут при 20°C (Beckman Coulter, Франция). После супернатант фильтровали с помощью стерилизованной вакуумной системы размером 0,22 мкм, отфильтрованную сыворотку концентрировали центрифугированием при 4000 g при 20°C с использованием ультрацентрифужных пробирок Amicon 1000K до полу-

чения 3 мл конечного концентрата. Полученный ретентат подвергли ультрацентрифугированию для гранулирования внеклеточных везикул при 33 000 g в течение 1 часа 10 минут при 4°C. Затем осадок суспендировали в 500 мкл раствора натрий-фосфатного буфера и добавляли к 11 мл градиенту сахарозы 5-40%. Далее полученную смесь ультрацентрифугировали при 34 000 g в течение 18 часов при 4°C. Всего было собрано 12 фракций по 1 мл. Фракции, ранее продемонстрированные как обогащенные экзосомами, суспендировали в 50 мкл натрий-фосфатного буфера и хранили при -80 °С до дальнейших анализов.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)

Внеклеточные везикулы анализировали на электронном микроскопе в виде целых пузырьков нанесенных на медные/углеродные сетки в течение 5 минут, затем концентрировали в течение 10 секунд в среде с 1% уранилацетатом. Сетки исследовали с помощью электронного микроскопа Hitachi HT7700 (Elexience, Франция) и изображения получали с помощью камеры с дополнительным прибором зарядовой связью.

Анализ отслеживания наночастиц

Распределение размеров и концентрации внеклеточных везикул измеряли с помощью NanoSight (NS300) (Malvern Instruments Ltd., Малверн, Вустершир, Великобритания) в соответствии с инструкциями производителя. Монохроматический лазерный луч при длине волны 405 нм пропускали через разбавленную суспензию везикул. Температура образца полностью программируется с помощью программного обеспечения NTA (версия 3.2 Dev Build 3.2.16). Было снято 30-секундное видео с частотой 30 кадров в секунду и анализом движения частиц с помощью программного обеспечения NTA.

Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE)

Фракции, потенциально содержащие внеклеточные везикулы, разгоняли на электрофореze белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) с использованием 4-15% предварительно подготовленных гелей Mini-PROTEAN® TGXTM (Bio-Rad, Франция). Образцы готовили с использованием лизирующего буфера Лэммли с β-меркаптоэтанолом и денатурировали при 100°C в течение 15 минут (Laemli, 1970). Разделение проводили в вертикальном электрофорезном аппарате (Bio-Rad, Франция). После электрофореза гели окрашивали реагентом кра-

сителем QuickStart™ Брэдфорд (Biorad) 1X и сканировали с помощью ImageScanner III (Epson Expression™ 10 000 XL, Швеция).

Протеомный анализ

Для оценки концентрации общих внеклеточных везикул был использован анализ белка Coomassie Brilliant Blue. Поглощение при 595 нм измеряли с использованием спектрофотометра (Shimadzu, Япония). Стандартная эталонная кривая была сделана с коммерческим бычьим сывороточным альбумином 1 мг / мл (Thermo Fischer Scientific, США).

Восстановление дисульфидных мостиков белков инкубировали при 37°C в течение одного часа с дитиотреитолом (Sigma, США), в то время как алкилирование свободных остатков цистеинила йодацетамидом (Sigma, США) при комнатной температуре в течение 45 минут в полной темноте. После того как кусочки геля были дважды промыты, сначала 100 мкл 50% ацетонитрила/50 mM гидрокарбоната аммония, а затем 50 мкМ ацетонитрила, они были тщательно высушены. Гидратацию проводили при 37°C в течение 12 часов с использованием расщепляющего буфера 400 нг лизин-С протеазы + трипсина. При этом пептиды экстрагировали 50% ацетонитрил/0,5% трифторуксусной кислотой, а затем 100% ацетонитрилом. Пептидные растворы сушили в концентраторе и растворяли в 70 мкл 2% ацетонитрила в 0,08% трифторуксусной кислоте.

Идентификацию пептидов проводили с использованием наносистемы RSLC UltiMate™ 3000 (Thermo Fisher Scientific, США), соединенной с масс-спектрометром QExactive (Thermo Scientific Fisher, США).

Каждый образец вводили со скоростью потока 20 мкл/мин и картридж с предварительной колонкой (C18 PepMap 100, 5 мкм, колонка: 300 мкм x 5 мм). Колонка PepMap C18 (стационарная фаза: RSLC PepMap 100, 2 мкм, колонка: 75 мкм x 150 мм). Один прогон занимал 42 минуты, включая стадии регенерации и уравнивания при 98% B.

Пептид-ионы анализировали с использованием Xcalibur 2.1, настроенной в режиме CID: 1) полное сканирование MS в QExactive с разрешением 15000 (диапазон сканирования [m / z] = 300-1,600) и 2) 8 лучших в MS/MS использует CID (35% энергии столкновения) в ионной ловушке. Анализируемые состояния нагрузки были установлены на 2-3, динамическое исключение – на 30 с, а порог интенсивности был установлен на 5,0 × 10².

Необработанные данные были преобразованы в mzXML с помощью MS convert (ProteoWizard версия 3.0.4601). Использовалась база данных UniProtKB Cetartiodactyla (157 113 записей белков, версия 2015), в сочетании с базами данных о загрязнителях проводился поиск по алгоритму X! TandemPiledriver (версия 2015.04.01.1) с помощью программного обеспечения X! TandemPipeline (версия 3.4), разработанного платформой PAPPISO (<http://rapprso.inra.fr/bioinfo/>). Белки были протестированы с допуском по массе 10 ppm и допуском по массовому фрагменту 0,5 Да. Правила ферментативного расщепления были установлены для расщепления трипсином («после R и K, если P не следует непосредственно после»), и не допускались правила полуферментативного расщепления. Окисление метиламина и метионина рассматривалось как потенциальная модификация с E-значением 0,05, E-значением белка -2,6 и минимум двумя пептидами.

Биоинформатика и анализ функционального обогащения

Анализ функционального обогащения на экзосомы, полученных из верблюжьего молока, был выполнен с использованием онлайн-программного обеспечения для аннотации генов «База данных для аннотаций, визуализации и комплексного обнаружения (DAVID)», версия 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp/>).

Результаты исследований

Экстракция внеклеточных везикул из верблюжьего молока

Внеклеточные везикулы или экзосомы можно выделить различными методами: ультрацентрифугирование, фильтрацию, иммуноаффинное выделение и техническую микрофлюидику (Witwer et al. 2013). При выборе метода ультрацентрифугирования основное руководство основывалось на степени чистоты и концентрации экзосом. Общие протоколы выделения экзосом из супернатантов клеточных культур и жидкостей организма включают стадии дифференциального ультрацентрифугирования и дальнейшей очистки в градиенте плотности сахарозы (Zonneveld et al. 2014). В настоящее время доступны коммерчески производственные наборы для выделения экзосом; однако они не адаптированы для образцов молока, тем более такого экзотического вида молока как верблю-

жье. Выделение экзосом из молока осложняется составными компонентами молока, которые значительно разнятся у разных видов в зависимости от стадии лактации, физиологического состояния и состояния здоровья.

В нашем исследовании для выделения экзосом из молока верблюдиц был выполнен «золотой стандарт», включающий дифференциальное ультрацентрифугирование с градиентом по плотности сахарозы. Сначала дифференциальным ультрацентрифугированием смесь была очищена от молочного жира, клеток и «клеточного мусора». Добавленный в градиент сахарозы ресуспендированный осадок ультрацентрифугировали для его разделения и концентрации внеклеточных везикул. После полученные фракции, обогащенные экзосомами, были объединены от 10 до 12.

Морфология экзосом выделенных из верблюжьего молока

Метод, включающий дифференциальное ультрацентрифугирование с ультрацентрифугированием в градиенте плотности, известен, как подходящий для эффективного выделения и очистки экзосом более высокого качества с интактной нативной морфологией (Yamada et al. 2012). Чтобы визуализировать и охарактеризовать морфологию и распределение по размерам молочных экзосом, нами проведены анализ просвечивающей электронной микроскопии и анализ отслеживания наночастиц.

Во всех проанализированных пробах молока наблюдается высокое содержание гомогенной популяции внеклеточных везикул, обогащенных сферическими экзосомами, со средним выходом с $9,49 \times 10^8 - 4,18 \times 10^{10}$ частиц на миллилитр.

Средние размеры везикул варьировались от 25 до 170 нм в диаметре. Классическая морфология внеклеточных везикул была отмечена без достоверных различий между образцами *C. dromedarius*, *C. bactrianus* и гибридами (Рисунок 1).

Такие результаты подтверждают, выделение экзосом с высокой чистотой, более высокого качества с интактными морфологическими структурами. На основании более ранних наблюдений, описанных для молока одногорбых верблюдиц (Yassin et al. 2016) и молока других видов, таких как коровье (Reinhardt et al. 2013), свиное (Chen et al. 2016), кобылье (Sedykh et al. 2017) и грудное (Admyre et al. 2007), полученные характеристики для молока *Camelus* кажутся об-

щими для внеклеточных везикул между видами. Таким образом, можно сделать вывод, что метод дифференциального ультрацентрифугирования

с ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы привел к эффективной и надежной экстракции экзосом из верблюжьего молока.

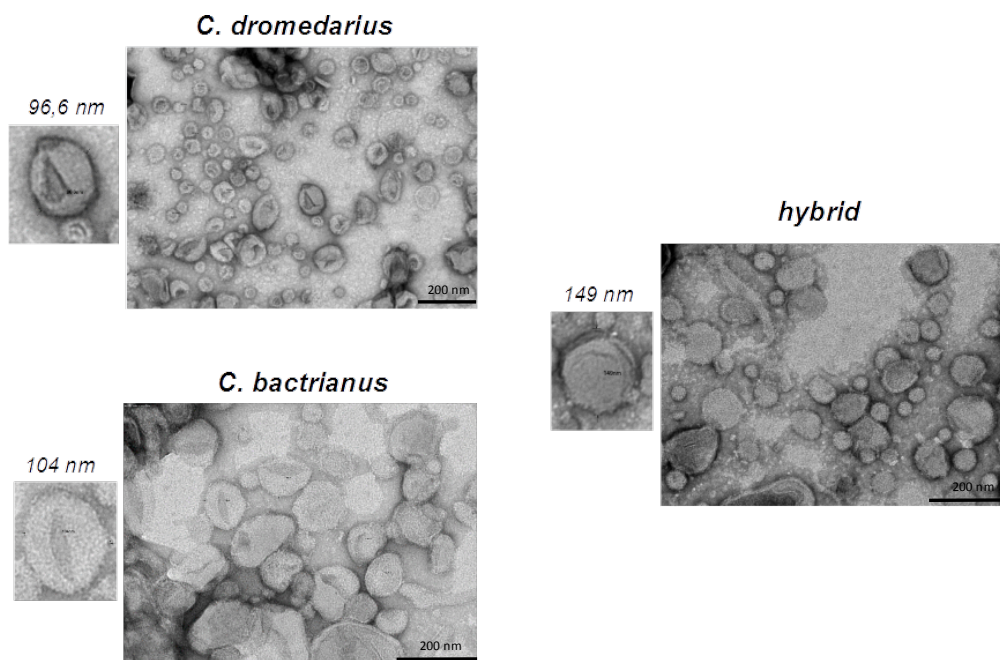


Рисунок 1 – Репрезентативные электронные микрофотографии экзосом *C. dromedarius*, *C. bactrianus* и гибридов, полученных из верблюжьего молока. Шкала увеличения состояла из а) 1 мкм, б) 500 нм, в) 200 нм.

Углубленный протеомный анализ экзосом верблюжьего молока

Специфический белковый состав позволяет охарактеризовать внеклеточные везикулы. Для идентификации белков экзосом верблюжьего молока были проведены обширные анализы, включающие разделение в одномерном геле электрофорезе, расщепление трипсином, ЖХ-МС/МС (Exactive Q, Thermo Fisher Scientific, США) и работа с поиском в международных базах данных как было описано Ryskalieva et al, 2018.

В настоящее время в экзосомах грудного молока было идентифицировано в общей сложности 1 963 белка, а в экзосомах коровьего молока было описано 2 107 отдельных белков (Reinhardt et al. 2012). В ходе наших исследований в экзосомах 15 проб верблюжьего молока (*C. bactrianus*, n = 5, *C. dromedarius*, n = 5, и гибридов, n = 5) было обнаружено в общей сложности 1 010 функциональных групп белков. Среди них доля пептидов, общих для трех видов составляет 890 белков, при том, что существуют определенное количество белков, различающих три вида, ко-

торые являются характерными для *C. bactrianus* – 31 белков, для *C. dromedarius* – 5 белков, а для гибридов – 12 белков. Используя базу данных UniprotKB по таксономии Cetartiodactyla (SwissProt + Tremor), белки были идентифицированы как достоверно совпадающие с белками в базах данных белков *Camelus* (*C. dromedarius*, *C. bactrianus* и *C. ferus*), а также с другими видами млекопитающих, такими как *Lama glama*, *Lama guanicoe*, *Bos taurus*, *Bos mutus*, *Sus scrofa* и *Ovis aries* и другие (Ryskalieva et al, 2019).

Протеомные исследования экзосом верблюжьего молока в данной работе существенно шире по сравнению с трудами ранних работ по верблюжьему молоку. Ранее 391 функциональные группы белков были идентифицированы из 8 образцов верблюжьего молока с использованием менее чувствительного ЖХ-МС/МС (LTQ Orbitrap XLTM Discovery, Thermo Fisher Scientific) анализа, из которых 235 функциональных групп выявлены общими для всех трех видов образцов: бактрианов, дромедаров и гибридов. Пока на данной стадии развития исследований в данной области сложно утверж-

дать какие из двух данных наиболее достоверны. Прежде всего, хотелось бы дополнить, что большинство таких приборов, как анализатор Q Exactive (Q Exactive vs LTQ Orbitrap), с точки зрения чувствительности, значительно улучшил масс-спектрометры Orbitrap.

Экзосомы – богатый источник потенциальных биомаркеров молока

Выделение экзосом из молока осложняется высоким содержанием липидов в молоке (Witwer et al. 2013). Липиды высвобождаются в молоке в виде жировых шариков эпителиальными клетками молочной железы. Эти жировые шарики представляют собой капли липидов, окруженные сложным трехслойным фосфолипидным белком, содержащим белки и гликопротеины, и, таким образом, представляют собой тип внеклеточных везикул. Мембраны жировых шариков в значительной степени неоднородны по размеру, а их плавучая плотность отличается от плотности экзосом. Однако из-за их происхождения в плазматической мембране, везикулярной природы и высокого содержания в молоке, мембраны жировых глобул могут быть выделены вместе с другими популяциями внеклеточных везикул, присутствующими в молоке. Как и ожидалось, экзосомы верблюжьего молока в основном обогащены белками мембран жировых глобул, связанными с молоком, такими как синтаза жирных кислот, лактадгерином или белок мембраны жировых шариков молока, бутирофилин и ксантиндегидрогеназа. Указанные белки: синтаза жирных кислот, лактадгерином или белок мембраны жировых шариков молока, бутирофилин являются отрицательными ко-стимулирующими молекулами, ингибирующими противоопухолевые иммунные ответы, которые стали новыми целями в развитии исследований влияния рака и иммунотерапии (Kuhajda 2000).

Экзосомы верблюжьего молока высоко обогащены повсеместными, клеточно-специфическими и цитозольными белками, включая белки, связанные с эндосомным путем, который был вовлечен в экзогенный биогенез. Все популяции экзосом экспрессируются в избытке Rab ГТФазой, а именно таких как RAB1A, RAB11B, RAB5C, RAB18, RAB2A, RAB7A и RAB21. Rab ГТФаза являются ключевыми регуляторами внутриклеточного транспорта мембран, от образования транспортных пузырьков до их слитых мембран. Кроме того, экзосомы, полученные из верблюжьего молока, значительно обогащены определенными многофункциональными белками, такими как Alix -программируемая

гибель клеток, взаимодействующий с 6 белками PDCD6IP и TSG101 – чувствительный 101 ген к опухоли. Считается, что эти эндосомные сортировочные комплексы, необходимые для белковых компонентов транспорта (ESCRT) в процессе везикулярного транспорта, являются специфическим экзосомно-сегрегированным биомаркером во время его биогенеза (Samuel et al. 2017). Недавно стало известно, что синдекансинтенин-ALIX является важным регулятором мембранного транспорта и передачи сигналов с помощью гепарансульфата, который влияет на патологические процессы, включая рак, распространение прионов, воспаление, отложение амилоидов и нейродегенеративные заболевания (Baietti et al. 2012). Более того, белки HSP70 и HSP90, участвующие во врожденных иммунных реакциях и презентации антигенов, участвуют в протеинкиназах сигнальной трансдукции и 14-3-3 белках, а также метаболические ферменты, такие как пероксидазы, пируваткиназы и α-енолаза тоже были обнаружены среди белков экзосом верблюжьего молока. Белки клеточной мембраны, такие как МНС I и МНС II, демонстрирующие природу анализируемых материалов, а также тубулин, актин и актин-связывающие белки были также высоко выражены в экзосомах верблюжьего молока.

Белки в протеоме многих препаратов экзосомных мембран могут просто отражать содержание белка в клетках, другие специфически обогащены экзосомами и поэтому могут быть определены как специфичные для экзосом маркерные белки. Помимо обеспечения питания для потомства, эти белки играют роль в межклеточной коммуникации посредством передачи биомолекул между клетками. Однако в настоящее время неизвестно, происходят ли экзосомы, обнаруженные в молоке, из иммунных клеток поступающих и присутствующих в молоке, из эпителиальных клеток молочной железы, из циркулирующих клеток, поступающих из других частей тела, или из видов бактерий, присутствующих в молочной железе при легкой хронической инфекции (например субклинический мастит).

Доступные протеомные исследования определяют специфические маркеры экзосом (мембранные и цитозольные белки) и специфическую подгруппу клеточных белков, которые специфически нацелены на экзосомы, функции которых до сих пор остаются неизвестными. Это особенно интересно в связи с их возможным участием в заболеваниях человека. Знание экзо-

сомной протеомики может помочь не только в их биологической роли, но также и в предоставлении новых биомаркеров (Raimondo et al. 2011). Среди наиболее важных белков в экзосомах – тетраспанины, которые играют главную роль в формировании экзосом и участвуют в процессах морфогенеза, деления и слияния. Недавно тетраспанины CD9, CD63 и CD81 были определены как новые маркеры, характеризующие гетерогенные популяции субтипированных внеклеточных везикул, присутствие которых, включая белки CD82 и TSPAN14, было подтверждено в экзосомах верблюжьего молока. Однако некоторые образцы экзосом были проанализированы на CD63. Ранее было известно об отсутствии этого тетраспанина в секретируемых экзосомах некоторыми клетками, а также сообщалось о наличии CD81- или CD9-несущих экзосом (Kowal et al. 2016).

Биоинформатика и анализ функционального обогащения

Для более обширного представления о субклеточном происхождении идентифицированных белков был проведен анализ «ген-ГО» с

использованием ресурсов биоинформатики DAVID 6.8. Выделенные нами экзосомы верблюжьего молока и образцы молока существенно обогащены внеклеточными экзосомными белками – 31,09% против 35,41% соответственно (Рисунок 2). Цитоплазматические белки – 19,58% экзосомных против 14,58% молочных белков, составляют доминирующую группу белков экзосом и верблюжьего молока (13,24% против 15,62% молока). Около 13,24% и 12,50% являются мембранными белками, идентифицированными в молочных верблюжьих молочных железах и пробах молока, соответственно. Мембранные белки-переносчики представляют собой белки Rab, которые принадлежат к подсемейству Ras малых ГТФаз. Функцией этих белков является центральная регуляция почкования везикул, их подвижности и слияния. Они играют роль в процессах эндоцитоза, транзитоза и экзоцитоза. Кроме того, некоторые мембранные белки внутриклеточных органелл, такие как цитозоль, митохондрия и аппарат Гольджи, высоко экспрессируемы во внеклеточные везикулы, полученных из проб верблюжьего молока.

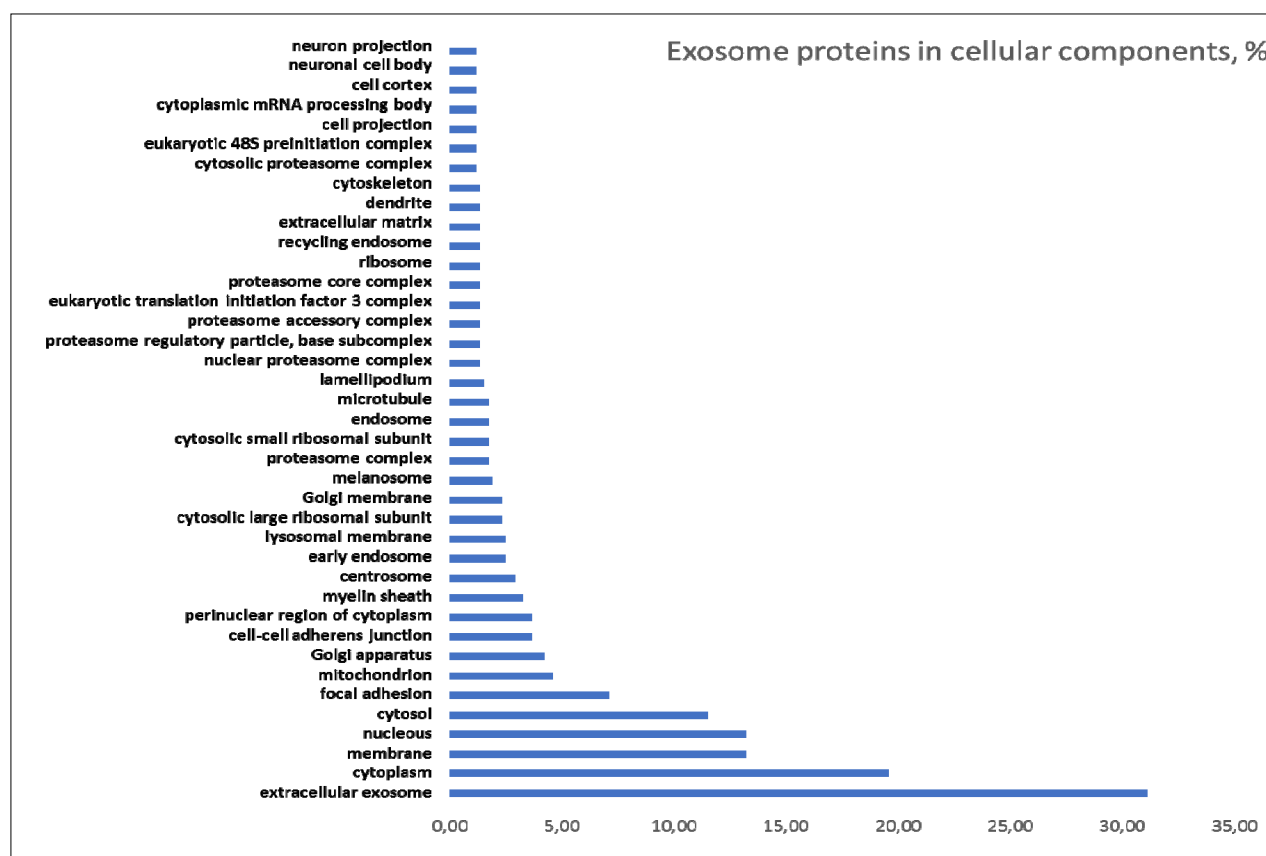


Рисунок 2 – Функциональные аннотации верблюжьего молока и молочных внеклеточных везикул, классифицированных по клеточным компонентам с использованием ресурсов биоинформатики DAVID 6.8.

Затем мы классифицировали белки, экспрессируемые в экзосомах верблюжьего молока, в соответствии с их биологическими процессами, молекулярными функциями и путями KEGG. Белки экзосом, полученные из верблюжьего молока, в основном связаны:

- с эндоцитозом (5,57%),
- инфекцией вируса Эпштейна-Барра (4,03%),
- рибосомами (3,84%),
- протеасомами (3,45%),
- транспортом РНК
- вирусным канцерогенезом (2,50%) среди путей KEGG.

Известно, что экзосомы обладают широким разнообразием иммуномодулирующих свойств. В-клетки, трансформированные вирусом Эпштейна-Барра (EBV), способны стимулировать CD4 + Т-клетки антигенно-специфическим образом (Keller et al. 2006).

Наблюдаемые белки внеклеточных везикул задействованы в 26 терминах биологического процесса (Рисунок 3). Распространенные био-

логические процессы белков экзосом связаны с синтезом экзосом и процессами их секреции:

- внутриклеточный транспорт белков (5,57%),
- трансляция (3,45%),
- клеточная адгезия и транспорт белков (3,26%),
- поступательная инициация.

Экзосомы все чаще признаются в качестве посредников межклеточной коммуникации благодаря их способности сливаться и передавать репертуар биоактивного молекулярного содержимого (груза) клеткам-реципиентам. Кроме того, белки экзосом в основном участвуют в клеточных функциях, таких как связывание поли(А)РНК и АТФ (9,60%), связывание белков и структурные компоненты рибосом (3,65%). Около 3,84% белков связаны с функцией связывания ГТФ, регулирующей процесс мембранно-везикулярного транспорта. Белки, экспрессируемые в экзосомах, полученных из верблюжьего молока, были разделены на 34 различных пути KEGG.

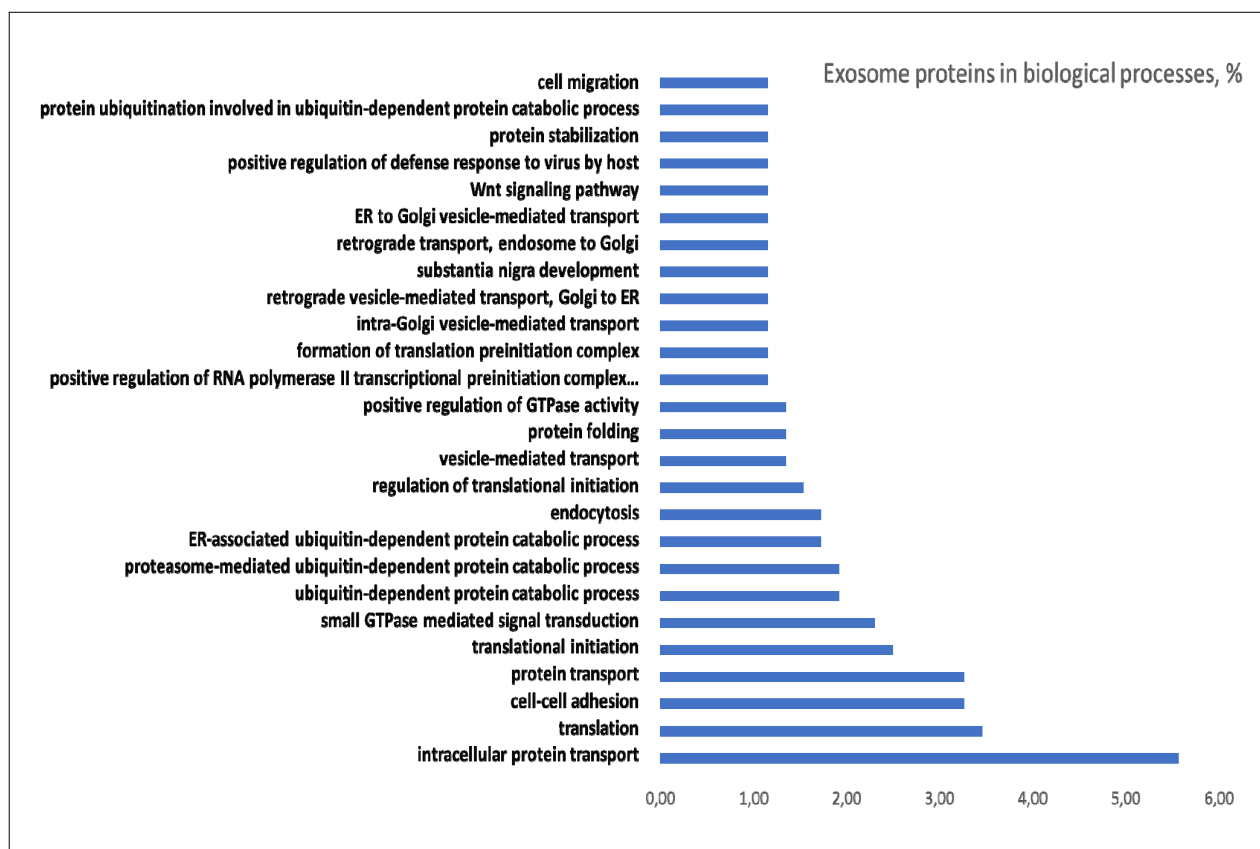


Рисунок 3 – Анализ обогащения белков неклеточных везикул верблюжьего молока, классифицированных по биологическим процессам с использованием ресурсов биоинформатики DAVID 6.8.

За последнее десятилетие экзосомы широко используются в качестве биологических нановезикул для разработки новых диагностических и терапевтических биомаркеров при различных заболеваниях (Kanada et al. 2015). МНС-пептидные комплексы экзосом, секретируемые дендритными клетками, обеспечивают эффективную активацию Т-лимфоцитов, демонстрируя тем самым иммунотерапевтический потенциал в качестве промоторов адаптивных иммунных реакций (Keller et al. 2006). Недавние исследования показали, что полученные из коровьего молока экзосомы выступают в качестве носителя для химиотерапевтических/химиопрофилактических средств против ксенотрансплантатов опухоли легких *in vivo* (Munagala et al. 2016). Тем не менее, трудно оценить их физиологическую значимость, поскольку их происхождение, механизмы биогенеза и секреции остаются до сих пор малоизученными, от этого загадочными.

Заключение

Новизна результатов состоит в исследованиях на таких биологических объектах как двугорбые верблюды и гибриды. Впервые проведены исследования по выделению и характеристике внеклеточных везикул молока трех видов верблюдов. Также впервые проведен протеомный анализ белков внеклеточных везикул верблюжьего молока. Проведена первичная классификация на определение происхождения экзосомных белков в экзосомах.

Используя оптимизированный метод выделения, мы получили внеклеточные везикулы молока верблюдиц (*C. dromedarius*, *C. bactrianus* и гибриды) Алматинской, Туркестанской, Кызылординской и Атырауской областей Казахстана. Анализ ЖХ-МС/МС позволил идентифицировать 1010 различных белков, представляющие собой первый комплексный протеом внеклеточных везикул верблюжьего молока, который значительно шире протеома самого молока. Как упомянуто ранее, у других видов внеклеточных везикул верблюжьего молока содержатся белки, также присутствующие в других компонентах молока. Это особенно относится к лактадгерину (основной компонент мембран жировых шариков – MFG-E8), Ras-связанным белкам или CD9. Наши результаты убедительно свидетельствуют о том, что полученные из молока экзосомы имеют различное клеточное происхождение.

Действительно, помимо экзосом, происходящих из эпителиальных клеток молочной

железы, существуют экзосомы из иммунных клеток, полученных из молока. Если учесть, что полученные из молока экзосомы также несут микроРНК, эти везикулы должны быть признаны в качестве еще одного важного биологически активного компонента молока, который может участвовать в передаче сигналов от матери новорожденному, а также является источником факторов, потенциально ответственных за свойства, относящихся к верблюжьему молоку и его легендарным лечебным свойствам для потребителей.

Ранее установлены специфические маркеры внеклеточных везикул (мембранные и цитозольные белки) и специфические подгруппы клеточных белков, нацеленных специфически на экзосомы, функция которых до сих пор остается неизвестной. Это особенно интересно в связи с их возможным участием в заболеваниях человека. Следовательно, знание экзосомной протеомики может помочь не только в понимании их биологических ролей, но и в предоставлении новых биомаркеров.

Большая часть потребителей верят в легендарные лечебные свойства верблюжьего молока. При том, что объективных данных об их терапевтических свойствах нет люди верят и готовы покупать продукцию из верблюжьего молока по более высокой цене, чем из коровьего молока. Поэтому важно продолжать исследования в области верблюжьего молока на фундаментальном уровне. Рано или поздно фундаментальные знания о верблюьем молоке смогут объяснить многие технологические, терапевтические и органолептические его свойства (Konuspayeva 2019).

Благодарности

Группа авторов благодарит за поддержку руководство ТОО НПП Антиген, в лице проф. Ахметсадыкова Н.Н.

Источник финансирования

Данное исследование финансируется Комитетом науки Министерства образования и науки Республики Казахстан – грант № AP05134760 «Протеомные исследования экзосом молока *Camelus bactrianus* и *Camelus dromedarius*».

Конфликт интересов

Отсутствует.

Литература

- 1 Colombo, Marina, Graça Raposo, and Clotilde Théry. 2014. "Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30 (1): 255–89. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>.
- 2 Kabani, Mehdi, and Ronald Melki. 2016. "More than Just Trash Bins? Potential Roles for Extracellular Vesicles in the Vertical and Horizontal Transmission of Yeast Prions." *Current Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0534-6>.
- 3 Hromada, Carina, Severin Mühleder, Johannes Grillari, Heinz Redl, and Wolfgang Holnthoner. 2017. "Endothelial Extracellular Vesicles—Promises and Challenges." *Frontiers in Physiology*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00275>.
- 4 Pol, E. van der, A. N. Boing, P. Harrison, A. Sturk, and R. Nieuwland. 2012. "Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles." *Pharmacological Reviews* 64 (3): 676–705. <https://doi.org/10.1124/pr.112.005983>.
- 5 Abels, E. R., & Breakefield, O. (2016). Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36(3), 301–312. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0366-z>
- 6 Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685. doi:10.1038/227680a0
- 7 Witwer, Kenneth W., Edit I. Buzás, Lynne T. Bemis, Adriana Bora, Cecilia Lässer, Jan Lötvall, Esther N. Nolte-’t Hoen, et al. 2013. "Standardization of Sample Collection, Isolation and Analysis Methods in Extracellular Vesicle Research." *Journal of Extracellular Vesicles*. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20360>.
- 8 Zonneveld, Marijke I., Alain R. Brisson, Martijn J.C. van Herwijnen, Sisareuth Tan, Chris H.A. van de Lest, Frank A. Re-degeld, Johan Garssen, Marca H.M. Wauben, and Esther Nolte t.N.M. Hoen. 2014. "Recovery of Extracellular Vesicles from Human Breast Milk Is Influenced by Sample Collection and Vesicle Isolation Procedures." *Journal of Extracellular Vesicles*. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24215>.
- 9 Yamada, Tetsuya, Yasuo Inoshima, Tsukasa Matsuda, and Naotaka Ishiguro. 2012. "Comparison of Methods for Isolating Exosomes from Bovine Milk." *Journal of Veterinary Medical Science* 74 (11): 1523–25. <https://doi.org/10.1292/jvms.12-0032>.
- 10 Yassin, Aya M., Marwa I. Abdel Hamid, Omar A. Farid, Hassan Amer, and Mohamad Warda. 2016. "Dromedary Milk Exosomes as Mammary Transcriptome Nano-Vehicle: Their Isolation, Vesicular and Phospholipidomic Characterizations." *Journal of Advanced Research* 7 (5): 749–56. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.10.003>.
- 11 Reinhardt, Timothy A., Randy E. Sacco, Brian J. Nonnecke, and John D. Lippolis. 2013. "Bovine Milk Proteome: Quantitative Changes in Normal Milk Exosomes, Milk Fat Globule Membranes and Whey Proteomes Resulting from *Staphylococcus Aureus* Mastitis." *Journal of Proteomics* 82: 141–54. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.02.013>.
- 12 Chen, Ting, Mei Ying Xie, Jia Jie Sun, Rui Song Ye, Xiao Cheng, Rui Ping Sun, Li Min Wei, et al. 2016. "Porcine Milk-Derived Exosomes Promote Proliferation of Intestinal Epithelial Cells." *Scientific Reports* 6. <https://doi.org/10.1038/srep33862>.
- 13 Sedykh, Sergey E., Lada V. Purvinish, Artem S. Monogarov, Evgeniya E. Burkova, Alina E. Grigor’eva, Dmitrii V. Bulgakov, Pavel S. Dmitrenok, Valentin V. Vlassov, Elena I. Ryabchikova, and Georgy A. Nevinsky. 2017. "Purified Horse Milk Exosomes Contain an Unpredictable Small Number of Major Proteins." *Biochimie Open* 4: 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.bio-pen.2017.02.004>.
- 14 Admyre, C., S. M. Johansson, K. R. Qazi, J.-J.r Filen, R. Lahesmaa, M. Norman, E. P. A. Neve, A. Scheynius, and S. Gabrielsson. 2007. "Exosomes with Immune Modulatory Features Are Present in Human Breast Milk." *The Journal of Immunology* 179 (3): 1969–78. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1969>.
- 15 Ryskaliyeva A., Henry C., Miranda G., Faye B., Konuspayeva G., Martin P. 2018. Combining different proteomic approaches to resolve complexity of the milk protein fraction of dromedary, Bactrian camels and hybrids, from different regions of Kazakhstan. *PLoS ONE* 13(5): e0197026. 1-26. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0197026>. May 10, 2018.
- 16 Reinhardt, Timothy A., John D. Lippolis, Brian J. Nonnecke, and Randy E. Sacco. 2012. "Bovine Milk Exosome Proteome." *Journal of Proteomics* 75 (5): 1486–92. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.11.017>.
- 17 Ryskaliyeva A., Henry C., Miranda G., Faye B., Konuspayeva G., Martin P. 2019. Alternative splicing events expand molecular diversity of camel CSN1S2 increasing its ability to generate potentially bioactive peptides. *Scientific reports*, 9:5243, 1-13, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41649-5>
- 18 Kuhajda, F P. 2000. "Fatty-Acid Synthase and Human Cancer: New Perspectives on Its Role in Tumor Biology." *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 16 (3): 202–8. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(99\)00266-X](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(99)00266-X).
- 19 Samuel, Monisha, David Chisanga, Michael Liem, Shivakumar Keerthikumar, Sushma Anand, Ching Seng Ang, Christopher G. Adda, Ellen Versteegen, Markandeya Jois, and Suresh Mathivanan. 2017. "Bovine Milk-Derived Exosomes from Colostrum Are Enriched with Proteins Implicated in Immune Response and Growth." *Scientific Reports* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06288-8>.
- 20 Baietti, Maria Francesca, Zhe Zhang, Eva Mortier, Aurélie Melchior, Gisèle Degeest, Annelies Geeraerts, Ylva Ivarsson, et al. 2012. "Syndecan-Syntenin-ALIX Regulates the Biogenesis of Exosomes." *Nature Cell Biology* 14 (7): 677–85. <https://doi.org/10.1038/ncb2502>.
- 21 Raimondo, Francesca, Lavinia Morosi, Clizia Chinello, Fulvio Magni, and Marina Pitto. 2011. "Advances in Membranous Vesicle and Exosome Proteomics Improving Biological Understanding and Biomarker Discovery." *Proteomics*. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000422>.

22 Kowal, Joanna, Guillaume Arras, Marina Colombo, Mabel Jouve, Jakob Paul Morath, Bjarke Primdal-Bengtson, Florent Dingli, Damarys Loew, Mercedes Tkach, and Clotilde Théry. 2016. "Proteomic Comparison Defines Novel Markers to Characterize Heterogeneous Populations of Extracellular Vesicle Subtypes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (8): E968–77. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521230113>.

23 Keller, Sascha, Michael P. Sanderson, Alexander Stoeck, and Peter Altevogt. 2006. "Exosomes: From Biogenesis and Secretion to Biological Function." *Immunology Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2006.09.005>.

24 Kanada, Masamitsu, Michael H. Bachmann, Jonathan W. Hardy, Daniel Omar Frimannson, Laura Bronsart, Andrew Wang, Matthew D. Sylvester, et al. 2015. "Differential Fates of Biomolecules Delivered to Target Cells via Extracellular Vesicles." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201418401. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418401112>.

25 Munagala, Radha, Farrukh Aqil, Jeyaprakash Jeyabalan, and Ramesh C. Gupta. 2016. "Bovine Milk-Derived Exosomes for Drug Delivery." *Cancer Letters* 371 (1): 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.10.020>.